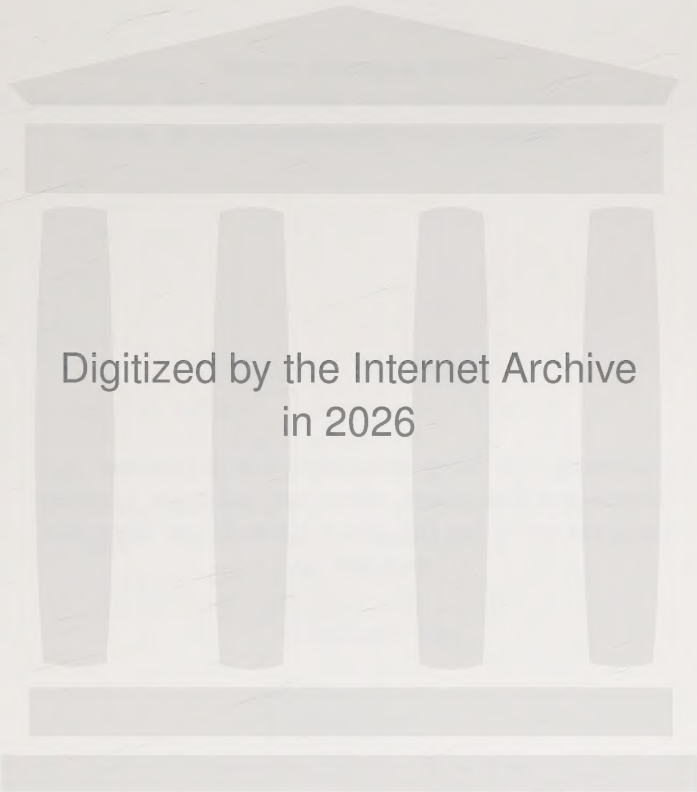


**Untersuchungen über die Reduktion der Toxizität
von Isopropylmethansulfonat durch
Extremitätenabbindung bei der Maus**

Bernd Schlieter

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Direktor: Professor Dr. Otto Hug

Untersuchungen über
die Reduktion der Toxizität von Isopropylmethansulfonat
durch Extremitätenabbindung bei der Maus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig - Maximilian - Universität
zu München

vorgelegt von

Bernd S C H L I E T E R
aus München

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. HUG
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. KIESE
Dekan: Prof. Dr. W. SPANN
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.1974



MEINER MUTTER

GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Material und Methode	
1. Versuchstiere und deren Haltung	3
2. Cytostatikum	3
3. Herstellung der IPMS-Suspensionen	3
4. Narkose	4
5. Abbindung	4
6. Bestrahlungsbedingungen	4
7. Ermittlung der Zahl der Knochenmark- zellen	5
8. Ermittlung der Zahl der peripheren Blutzellen	6
9. Milzkolonienmethode	6
Ergebnisse	
1. Die Veränderung des Körpergewichts und die Letalität nach verschiedenen Dosen IPMS.	8
2. Die Wirkung einer Extremitätenabbindung auf das Körpergewicht und die Letalität bei Verabreichung von IPMS.	10
3. Die Veränderungen der Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut nach verschiedenen IPMS-Dosen.	15
4. Der Einfluß des Zeitpunktes der IPMS- Injektion auf die Wirkung der Abbindung.	21
5. Einfluß der durch die Abbindung beding- ten Hypoxie über 60 min auf die Knochen- markstammzellen.	22
6. Die Abhängigkeit der Koloniebildungs- fähigkeit von Knochenmarkstammzellen von der IPMS-Dosis.	24
7. Die Abhängigkeit der Koloniebildungs- fähigkeit von Knochenmarkstammzellen in abgebundenen Beinen von der IPMS- Dosis.	28

Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse	31
1. Veränderung des Körpergewichts und der Letalität bei einer Extremitätenabbindung und nach verschiedenen IPMS-Dosen.	31
2. Der Einfluß verschiedener IPMS-Dosen auf die Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut.	34
3. Die Abhängigkeit der Koloniebildungsfähigkeit von Knochenmarkstammzellen von der IPMS-Dosis in abgebundenen und nicht abgebundenen Extremitäten.	36
Zusammenfassung	44
Literaturverzeichnis	46

I. Einleitung :

Bei der Therapie von bösartigen Tumoren werden in den letzten Jahren neben chirurgischen und radiologischen Maßnahmen in steigendem Maße Cytostatika allein oder zusätzlich angewandt. Dabei hemmen die Cytostatika durch Störung des Zellzyklus, besonders der DNS-Synthese, die Vermehrung proliferierender Zellen. Ihr Effekt ist aber nicht so spezifisch, daß nur Tumorzellen und Zellen neoplastischer Erkrankungen des hämopoetischen Systems angegriffen werden, sondern es werden auch die proliferierenden Zellen normaler Gewebe affiziert.

Bereits bei therapeutischen Dosen muß mit einer Störung der Funktion des Knochenmarks, der Schleimhäute des Verdauungstraktes, der Gonaden, der Haarwurzeln und im Falle einer Schwangerschaft mit Schädigungen des Fetus gerechnet werden.

Aus diesen unerwünschten Nebenwirkungen resultiert die sehr enge therapeutische Breite, die bei den meisten Cytostatika, auch dann, wenn der Tumor gut auf das Chemotherapeutikum anspricht, vor allem durch bedrohliche Störungen der Häthropoese begrenzt ist.

Jede Methode, welche die Toleranz der kritischen Gewebe erhöht, müßte zu einer Verbesserung der Resultate der Chemotherapie maligner Geschwülste führen.

Unsere Versuche in dieser Richtung gingen von strahlenbiologischen Erfahrungen aus. Schon 1949 hatten Jacobson et al. beobachtet, daß bei Mäusen durch Bleiabdeckung z.B. eines Femurs oder der Milz während einer Ganzkörperbestrahlung eine frühere hämatopoetische Erholung als bei bestrahlten Kontrolltieren erreicht wird.

Diese Befunde wurden später von Lamerton und Belcher, 1954, und Nowell und Cole, 1967, bestätigt. Sie waren der Ausgangspunkt für eine Therapie der akuten Strahlenkrankheit durch Transplantation von Knochenmarkszellen.

Von dem durch Abdeckung geschützten Teil des Knochenmarks kommt es vor allem bei Nagern zu einer Auswanderung von Knochenmarkstammzellen (Endotransplantation = Autotransplantation) und zu einer Repopulation des übrigen durch die Bestrahlung geschädigten Knochenmarks, sodaß eine aplastische Anämie weitgehend vermieden wird und die auftretenden Leuko- und Thrombopenien wesentlich schneller normalisiert werden. (Hellmann, 1965, und Fujioka et al., 1967).

Der gleiche Schutzeffekt kann durch Injektion von Stammzellen (Exotransplantation), die sich bei Mäusen im Knochenmark, in der Milz, im Blut, in der Peritonealflüssigkeit und in der fetalen Leber befinden, erreicht werden (Lorenz, Congdon und Uphoff, 1952; Till und McCulloch, 1961; Goodman und Hodgson, 1962; Goodman, 1963; Cole, 1963; Siminovitch, Till und McCulloch, 1965).

Somit ergab sich der Gedanke, ob sich in Analogie zu diesen strahlenbiologischen und strahlentherapeutischen Ergebnissen bei der Anwendung eines Cytostatikums dadurch ein Schutz des blutbildenden Systems erzielen läßt, daß während der Injektion durch kurzzeitige Abbindung einer Extremität ein Teil des Knochenmarks geschützt wird.

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Wirksamkeit einer solchen Abbindung im Tierexperiment und zwar

- a.) auf das Körpergewicht
- b.) auf die Letalität und
- c.) auf das Proliferationsverhalten der Knochenmarkszellen.

II. Material und Methode :

1. Versuchstiere und deren Haltung :

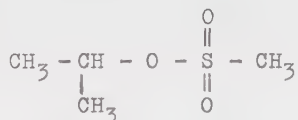
Die Experimente wurden an 8 - 16 Wochen alten männlichen und weiblichen Inzuchtmäusen vom Stamm NMRI durchgeführt. Je 5 Tiere wurden in Käfigen auf Spreu (Hobelspänen) gehalten. Die Raumtemperatur in den Tierställen betrug konstant 23-25°C. Die Tiere erhielten ein standardisiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum.

2. Cytostatikum :

Die Fragestellung erforderte die Verwendung eines kurzlebigen Cytostatikums.

In den folgenden Versuchen wurde deshalb Isopropylmethansulfonat (IPMS) benutzt, das eine kurze chemische Halbwertszeit hat. Laut Petrovic und Nias, 1967, beträgt die $T^{1/2}$ in vitro ca. 13 min bei 37°C und pH 7.

IPMS hat folgende Strukturformel :



Es ist eine ölige Flüssigkeit, die sich bei Zimmertemperatur leicht in Wasser löst.

3. Herstellung der IPMS-Suspension :

Die für die verschiedenen Dosierungen jeweils benötigten Mengen von IPMS wurden zu je 5 ml physiologischer NaCl-Lösung zugegeben. Die Vermischung erfolgte in einem in Eiswasser befindlichen 50 ml Becherglas durch Schütteln. Dabei war besonders auf vollständige Auflösung der IPMS-Grundsubstanz zu achten.

Den Versuchstieren wurden je 0,5 ml der hergestellten IPMS-Lösungen injiziert (intraperitoneal).

Dabei kam es wegen der kurzen Halbwertszeit von IPMS darauf an, daß das Intervall zwischen Ansetzen der Lösung und der Injektion möglichst kurz war. In keinem Fall wurden 7 min überschritten. Meist lag die benötigte Zeit bei 1 - 3 min.

4. Narkose :

In Versuchen mit Extremitätenabbindung und in einzelnen Kontrollversuchen wurden die Tiere mit einer Lösung aus Nembutal-Natrium narkotisiert. Die Konzentration der Lösung betrug 10 mg Nembutal-Na pro ml, die Injektionsmenge pro Tier 0,15 - 0,20 ml intraperitoneal. Die Wirkung wurde je nach Bedarf mit Diäthyläther als Inhalationsnarkotikum verstärkt.

5. Abbindung :

In Narkose wurden die hinteren Unterschenkel der Mäuse mit einem Plastik- bzw. Gummischlauch von 3,5 mm Durchmesser abgebunden.

Erst jetzt erfolgte bei den Abbindeversuchen die intraperitoneale Injektion von IPMS. Die Abbindung wurde abhängig vom Versuch 30 - 40 min nach der Injektion wieder gelöst.

6. Bestrahlungsbedingungen :

Zur Testung der Koloniebildungsfähigkeit von Knochenmarkszellen wurden Totalbestrahlungen der jeweiligen Empfängertiere mit einer Dosis von 850 - 900 R vorgenommen.

a.) In den meisten Versuchen wurde ein Röntgenapparat Typ MG 300 der Firma C.H.F. Müller, Hamburg verwendet.

Die Röhrenspannung betrug 280 kV, die Stromstärke 10 mA. Bei einer Eigenfilterung der Röhre durch 0,6 mm Cu und 1,0 mm Al betrug die Halbwertschichtdicke (HWS) ca. 4 cm in Wasser. Bestrahlt wurde in einem Fokusobjekt- abstand von 60 cm. Dabei wurde eine Dosislei-

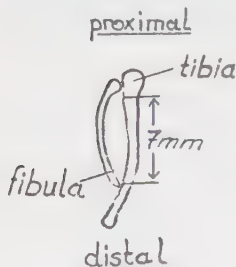
stung von ca. 50 R/min erreicht. Die Dosis wurde während der Bestrahlung ständig über ein RADOCON - Dosimeter der Firma, The Victoreen Instrument Co., Cleveland, Ohio kontrolliert.

Je 10 Tiere befanden sich während der Bestrahlung in einem Plastikkäfig, der durch einen mit Luftlöchern versehenen Plastikdeckel abgedeckt war.

- b.) Nur in den Versuchen 6 und 7 wurde die Bestrahlung mit den Gammastrahlen einer umschlossenen Caesium-137-Quelle (Caesa-Gammatron der Firma Siemens AG), deren Aktivität ca. 7000 Ci beträgt, bei einem Fokusobjekt Abstand von 88 cm und einer Dosisleistung von 25 R/min durchgeführt.

7. Ermittlung der Zahl der Knochenmarkzellen :

Die Versuchstiere wurden durch Einwirkung von Chloroform getötet, und ihre Tibien operativ entfernt. Jede Tibia wurde direkt oberhalb des distalen Ansatzes der Fibula mit einer Schere durchtrennt und dann noch einmal 7 mm weiter proximal (siehe Skizze).



Aus jedem dieser 7 mm langen Tibiateilstücke wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 20-iger Kanüle herausgestoßen und in je eine der Vertiefungen einer Tüpfelplatte (Rosenthal) gegeben, die mit 0,2 ml Essigsäure (3 %) gefüllt wurde.

Das klumpige Knochenmark wurde mit Kanülen und Pipetten gleichmäßig verteilt, so daß eine Knochenmarkszellsus-

pension entstand.

Durch die 3 %ige Essigsäure erfolgte eine Hämolyse der Erythrozyten. Nach einigen Minuten wurde die

Knochenmarkszellsuspension in eine Leukozytenpipette bis zur Marke 0,5 aufgezogen und TÜRKIS-Lösung (Merck) bis zur Marke 11 angesaugt.

Nach kräftigem Schütteln der Pipette wurde unter Verwerfung des ersten Teiles der in der Pipette befindlichen Knochenmarkszellsuspension eine BÜRKER-Zählkammer gefüllt und die 144 Quadrate bei schwacher Vergrößerung (ca. 100-fach) ausgezählt. Dabei ergaben sich für jede hintere Extremität eines Tieres 2 Werte, also 4 Werte pro Tier, die gemittelt wurden.

8. Ermittlung der Zahl der peripheren Blutzellen :

In Narkose wurde der Thorax der Mäuse eröffnet und mittels Herzpunktur Blut gewonnen. Das Blut wurde in einer Leukozytenpipette bis zur Marke 1,0 aufgezogen und TÜRKIS-Lösung bis zur Marke 11 angesaugt. Die Ermittlung der Zahl der peripheren Blutzellen erfolgte dann wie bei den Knochenmarkszellen (s.o.).

9. Milzkolonienmethode :

Die Milzkolonienmethode (nach Till und McCulloch, 1961) wurde folgendermaßen angewandt:

Spender-Mäusen wurde Knochenmark entnommen (s.o.) und dieses in eisgekühlter HANKS-Lösung (2-4 ml) verteilt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein Teil der Zellsuspension bis zur Marke 0,5 in eine Leukozytenpipette aufgezogen und TÜRKIS-Lösung bis zur Marke 11 angesaugt. Die Auszählung in der BÜRKER-Zählkammer erfolgte wie oben. Daraus wurde die Anzahl der Zellen pro ml Suspension errechnet. Durch Serienverdünnungen wurden Suspensionen hergestellt, die die notwendigen Zellzahlen für jede Experimentgruppe enthielten. Diese Suspensionen wurden bei Eistemperatur bis zur Injektion, die so bald als möglich erfolgte, aufbewahrt.

Je 0,5 ml der Suspensionen wurden den vorbestrahlten Empfänger-mäusen in eine Schwanzvene injiziert.

Diese Tiere waren 24 Std. zuvor einer Ganzkörperbestrahlung von 850 - 900 R ausgesetzt worden, um in deren Knochenmark die Proliferation aller Zellen weitestgehend aufzuheben, sodaß sich nur die transplantierten Stammzellen vermehren konnten.

Die überlebenden Empfängermäuse wurden nach 9 Tagen getötet, die Milz exstirpiert, in BOUIN'scher Lösung fixiert und die makroskopisch sichtbaren Milzkolonien gezählt.



KOLONIEN in der Milz einer mit 800 rad Ganzkörperdosis bestrahlten Maus 10 Tage nach intravenöser Injektion von 300.000 Knochenmarkszellen einer gesunden Maus (eigenes Präparat)

III. Ergebnisse :

1. Die Veränderung des Körpergewichts und die Letalität nach verschiedenen Dosen IPMS.

Zur Testung jeder Dosis wurden jeweils 9 - 10 Tiere verwandt. Sie wurden alle 2 Tage gewogen. Danach wurde das Durchschnittsgewicht je Gruppe bestimmt und die Gewichts Differenz zum mittleren Ausgangsgewicht der jeweiligen Gruppe errechnet (in %).

In Abb.1 sind die Veränderungen des mittleren Körpergewichts der verschiedenen Dosisgruppen in der Zeit nach Behandlung eingetragen, und zwar in Prozenten des Ausgangsgewichtes.

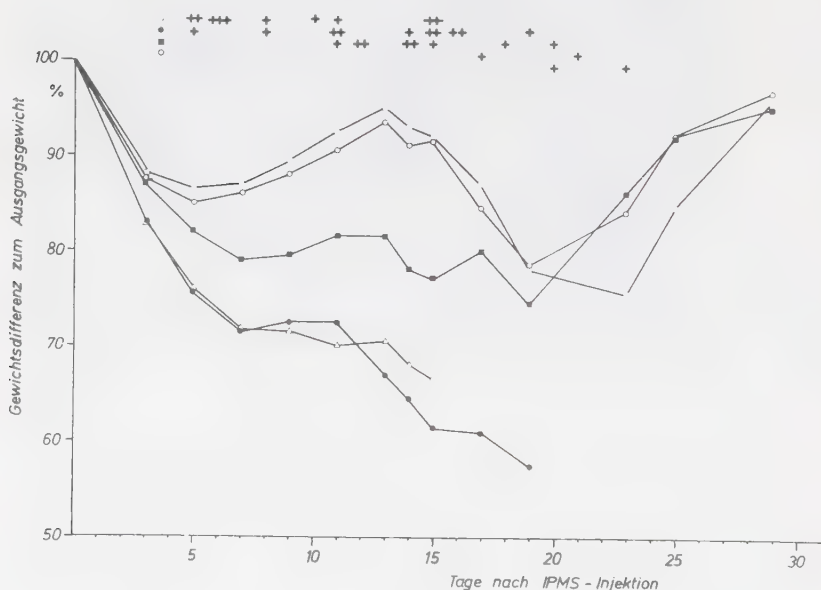


Abb. 1. Die Veränderungen des mittleren Körpergewichts bei verschiedenen IPMS-Dosen :

+ Markierung der jeweiligen Sterbetage der Tiere
(1 Kreuz pro Tier)

Δ 300 mg IPMS/kg KG

■ 270 mg IPMS/kg KG

- 240 mg IPMS/kg KG
- 210 mg IPMS/kg KG
- 180 mg IPMS/kg KG

Bei allen getesteten Dosen des Cytostatikums wird in den ersten Tagen ein beträchtlicher Gewichtsverlust beobachtet.

Je höher die applizierte Dosis, um so steiler fällt die Gewichtskurve ab, um so länger hält der Abfall an und um so tiefere Werte werden erreicht.

Bei den zwei kleineren Dosen (210 und 180 mg IPMS/kg KG) setzt am 5. Tag ein zeitweiliger Wiederanstieg ein, dem ab 13. Tag eine zweite Welle temporären Gewichtsverlustes folgt.

Nach Dosen von 300 und 270 mg IPMS/kg KG fallen die Gewichtskurven bis zum 7. Tag steil und von da an etwas flacher ab, ohne daß eine eindeutige Erholung einsetzt.

Um den 20. Tag post injectionem steigt das Gewicht bei den überlebenden Tieren wieder an und erreicht nach ca. 4 Wochen nahezu das Ausgangsgewicht.

Alle verabreichten Dosen des Cytostatikums führen zu einem Absterben eines Teiles der Tiere, wobei die Zahl der insgesamt innerhalb von 30 Tagen gestorbenen Tiere mit der Dosis zunimmt und sich gleichzeitig die Überlebenszeit verkürzt.

In Abb. 2 (Seite 10) ist für die einzelnen Dosisgruppen die kumulative Letalität gegen die Zeit aufgetragen.

Während bei den kleinsten verabreichten Dosen nur einzelne Todesfälle zwischen dem 17. und 23. Tag beobachtet werden, setzt die Letalität mit den höheren Dosen wesentlich früher ein. Bei 300 und 270 mg IPMS/kg KG sind alle Tiere nach 15 bzw.

19 Tagen gestorben. Die mittlere Überlebensdauer liegt für 300 mg IPMS bei 6 Tagen und bei 240 mg IPMS bei 14 Tagen.

Mit erheblichen statistischen Unsicherheiten läßt sich aus unseren Versuchen eine LD_{50} von 225 mg IPMS/kg KG für eine intraperitoneale Injektion ableiten.

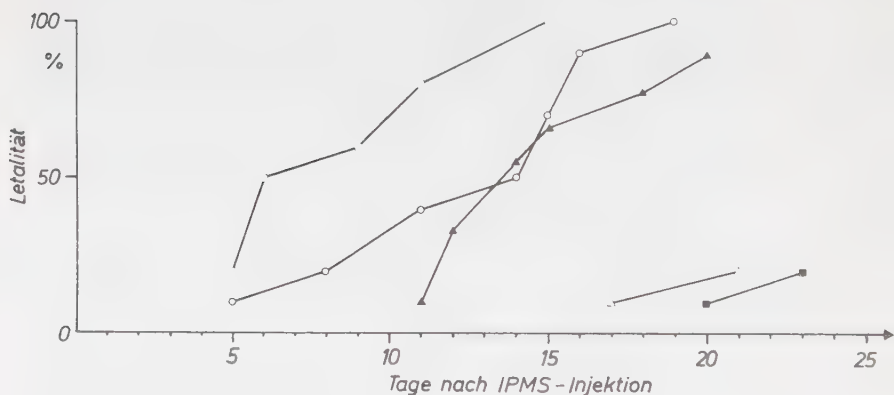


Abb. 2. Die Letalität bei verschiedenen Dosen IPMS

- | | |
|---------------------|---------------------|
| □ 300 mg IPMS/kg KG | △ 210 mg IPMS/kg KG |
| ○ 270 mg IPMS/kg KG | ■ 180 mg IPMS/kg KG |
| ▲ 240 mg IPMS/kg KG | |

2. Die Wirkung einer Extremitätenabbindung auf das Körpergewicht und die Letalität bei Verabreichung von IPMS.

Um zu prüfen, ob die Abbindung einer Extremität während der initialen Einwirkung des Cytostatikums einen Schutzeffekt ausübt, wurden in diesem Versuch insgesamt 20 Tieren 250 mg IPMS/kg KG i.p. injiziert. Bei der Hälfte der Tiere wurde kurz vor der

Injektion, wie im methodischen Teil beschrieben, ein hinterer Unterschenkel abgebunden. Die Abbin-
dung blieb 35 min liegen. Bei der Kurzlebigkeit
des Cytostatikums im tierischen Organismus ist zu
erwarten, daß nach Lösung der Abbindung nur noch
geringe Mengen in dem Gewebe der abgebundenen Ex-
tremität zur Wirkung kommen.

Die Abb. 3 gibt die Kurven des mittleren Kör-
pergewichts in Prozenten des Ausgangsgewichtes in
den beiden mit 250 mg IPMS/kg KG behandelten Tier-
gruppen wieder; Kurve A für die Tiere ohne Abbin-
dung und Kurve B für die Tiere mit Abbindung.

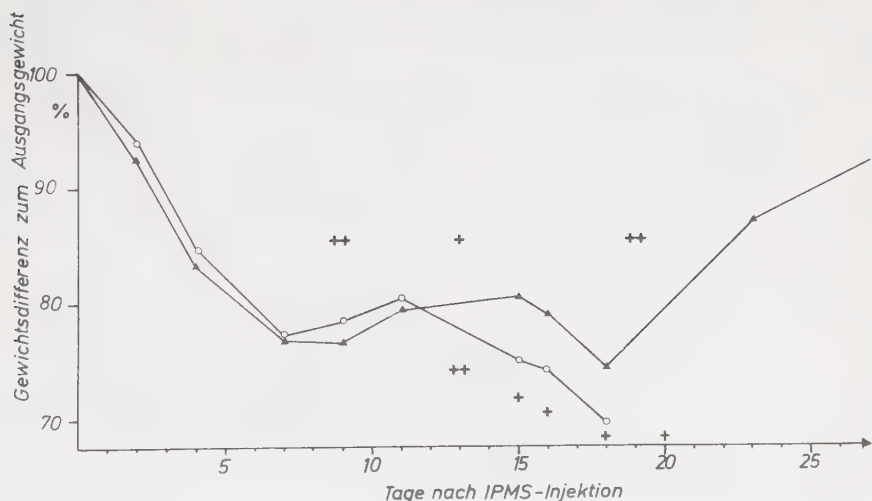


Abb. 3. Die Veränderungen des mittleren Körperge-
wichts bei 250 mg IPMS/kg KG und Tieren
ohne und mit abgebundener Extremität

- Kurve A : Tiere ohne Abbindung
- ▲ Kurve B : Tiere mit Abbindung
- + obere Reihe : Sterbetage der Tiere ohne Ab-
bindung (1 Kreuz pro Tier)
- + untere Reihe: Sterbetage der Tiere mit Ab-
bindung (1 Kreuz pro Tier)

Die beiden Kurven zeigen bis zum 12. Tag keine wesentlichen Unterschiede. Zwischen 12. und 18. Tag wird jedoch bei den Tieren mit abgebundener Extremität (Kurve B) die Gewichtsabnahme geringer. Der Wiederanstieg der Kurve B nach dem 18. Tag ist nur mit Vorbehalt zu werten, da zu dieser Zeit nur ein Tier überlebt.

In Abb. 4 wird die Absterbekurve der beiden Gruppen festgehalten.

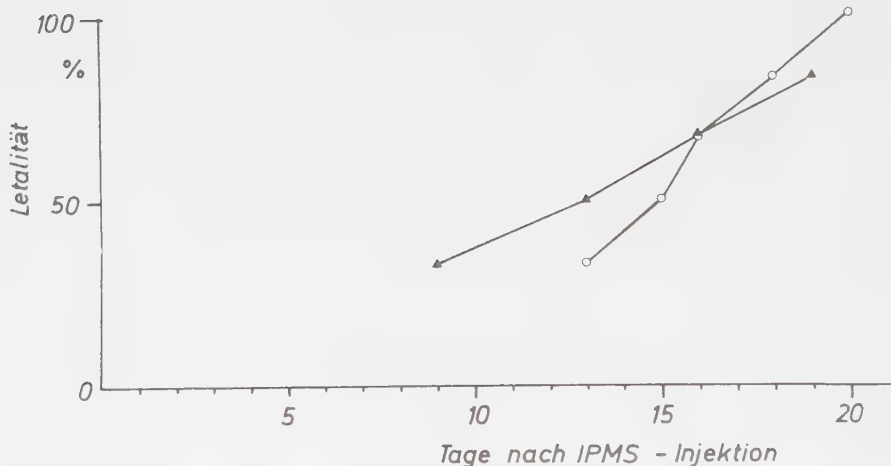


Abb. 4. Die Letalität von Tieren ohne und mit abgebundener Extremität bei 250 mg IPMS/kg KG

- Kurve A : Tiere ohne Abbindung
- ▲ Kurve B : Tiere mit Abbindung

Die Versuchstiere mit Abbindung kommen früher ad exitum als die Tiere ohne Abbindung. Dabei beträgt die mittlere Überlebensdauer bei Tieren mit abge-

bundener Extremität 13 Tage, bei Tieren ohne Abbindung 15 Tage. Nur eines der Tiere mit Abbindung überlebt.

Bei einem weiteren Versuch mit 300 mg IPMS weisen die Tiere mit Abbindung sogar noch ein schlechteres Ergebnis auf (siehe Abb. 5). Hier beträgt die mittlere Überlebensdauer bei den Tieren mit Abbindung 7 Tage, bei den Tieren ohne abgebundene Extremität 12 Tage. Alle Tiere starben innerhalb von 14 Tagen.

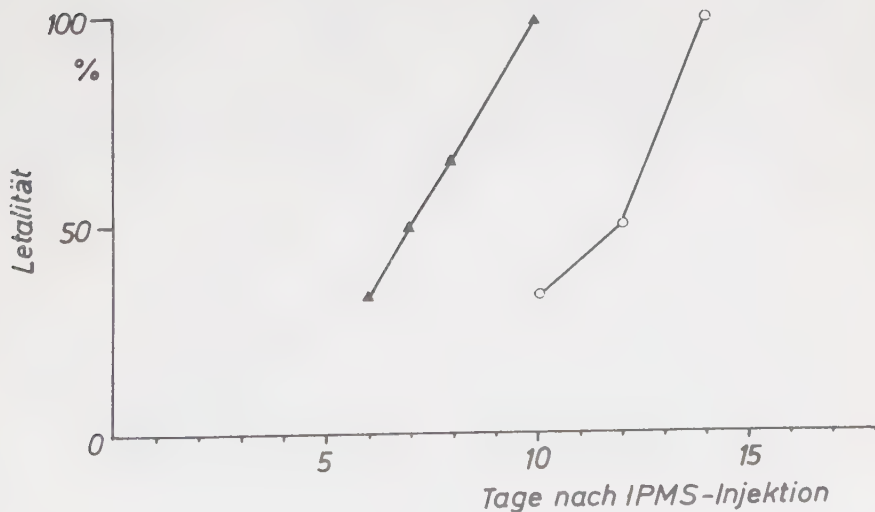


Abb. 5. Die Letalität von Tieren ohne und mit abgebundener Extremität bei 300 mg IPMS/kg KG

- Kurve A : Tiere ohne Abbindung
- ▲ Kurve B : Tiere mit Abbindung

Den Verlauf der Absterbekurven der Tiere mit Abbindung nach den verschiedenen IPMS-Dosen (von 180 - 330 mg IPMS/kg KG) ersieht man aus der Abb. 6.

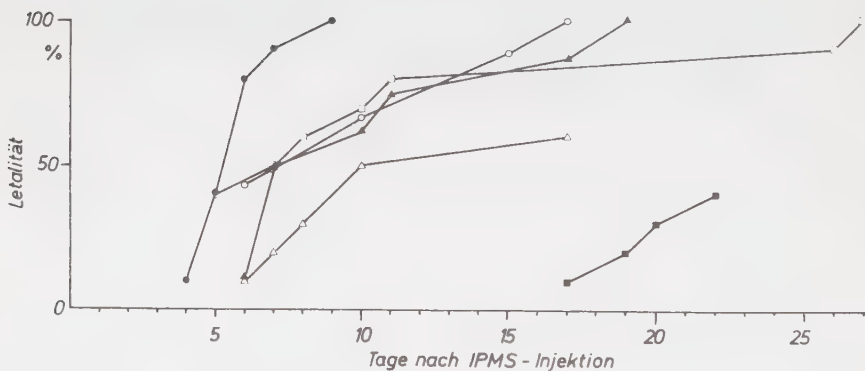


Abb. 6. Die Letalität bei verschiedenen Dosen IPMS und Tieren mit abgebundener Extremität

- | | |
|---------------------|---------------------|
| ● 330 mg IPMS/kg KG | ▲ 240 mg IPMS/kg KG |
| □ 300 mg IPMS/kg KG | △ 210 mg IPMS/kg KG |
| ○ 270 mg IPMS/kg KG | ■ 180 mg IPMS/kg KG |

Beim Vergleich mit der Abb. 2, S. 10 (Absterbekurven der Tiere ohne Abbindung) fällt auf, daß die Versuchstiere ohne Abbindung sowohl bei der mittleren Überlebensdauer als auch bei der Letalität günstiger abschneiden als die Tiere mit Abbindung, die durch die Abbindung eigentlich geschützt werden sollten (siehe Tab. 1, S. 15). Die LD_{50} der Tiere mit Abbindung liegt bei ca. 200 mg IPMS/kg KG.

Die mittlere Überlebensdauer nach der Injektion bei den Tieren mit Abbindung liegt sowohl für 300 mg, als auch für 240 mg IPMS/kg KG bei 7 Tagen.

Tab. 1.

Mittlere Überlebensdauer

Dosis	Mit Abbindung	Ohne Abbindung
300	7 Tage	6 Tage
270	7 Tage	14 Tage
240	7 Tage	14 Tage
210	10 Tage	19 Tage +
180	19 Tage +	22 Tage +
LD ₅₀	200 mg IPMS/kg KG	225 mg IPMS/kg KG

+ = für die nicht überlebenden Tiere

3. Die Veränderungen der Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut nach verschiedenen IPMS-Dosen.

Während die bisher beschriebenen Bestimmungen von Körpergewicht und Letalität der auf verschiedene Weise behandelten Tiere einen mehr orientierenden Charakter hatten, wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen geprüft, wie sich die Knochenmarkszellen unter der Einwirkung eines Cyto-
statikums verhalten und ob sich an ihnen direkt die Wirkung der Extremitätenabbindung bemerkbar macht.

- a.) Zunächst wurde bei 3 unbehandelten Tieren die Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut bestimmt. Dabei fanden sich im Knochenmark des jeweils entnommenen 7 mm

langen Tibiastückes 6,1 - 7,6 Millionen kernhaltiger Zellen.

In einem ersten Versuch ohne Abbindung wurden pro 144 Quadrate einer BÜRKER-Zählkammer nach verschiedenen IPMS-Dosen zu bestimmten Zeiten folgende Werte (siehe Tab. 2) im Knochenmark ermittelt und in Abb. 7 (S. 17) übertragen.

Tab. 2.

Zellzahlen pro 144 Quadrate

Zeit	300 mg	250 mg	200 mg	Kontrolle vor Be- handlung
	IPMS	IPMS	IPMS	
nach 1 Tag	831	835	965	972
nach 2 Tagen	509	979	1.185	
nach 3 Tagen	361	385	443	
nach 4 Tagen	332	-	366	
nach 5 Tagen	246	282	448	
nach 8 Tagen	153	273	319	
nach 10 Tagen	98	104	848 (?)	
nach 13 Tagen	97	136	191	
nach 15 Tagen	84	72	198	
nach 27 Tagen	alle tot	430	973	

Aus den Werten (Tab. 2 und Abb. 7, Seite 17) geht hervor, daß nach einem leichten Ansteigen der Zellzahlen am 2. Tag bei den Dosen 200 und 250 mg IPMS/kg KG, vom 3. Tag an ein steiler Abfall der Zellzahlen auftritt. Die Abnahme ist bei den verwendeten Dosen fast gleich groß, wenn auch während der gesamten Versuchszeit die Knochenmarkszellzahlen bei den niedrigen Dosen etwas über der Zahl bei den höheren Dosen liegen.

Vom 5. Tag an ist der Abfall der Zellzahlen geringer und hält sich dann über mehrere Tage (mindestens bis zum 15. Tag) konstant.

Bei den wenigen noch überlebenden Tieren wurde ein Anstieg der Zellzahlen bis zum 27. Tag beobachtet (gestrichelte Linie).

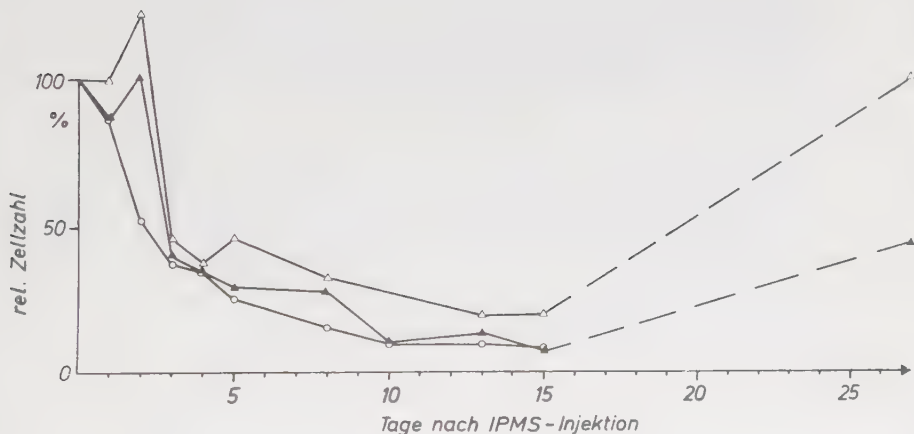


Abb. 7. Die Veränderungen der Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark nach verschiedenen IPMS-Dosen

△ 200 mg IPMS/kg KG

○ 300 mg IPMS/kg KG

▲ 250 mg IPMS/kg KG

- b.) In einem weiteren Versuch wurde bei je 15 Tieren und mit einer Dosis von 120 mg IPMS/kg KG der Verlauf der Knochenmarkszellzahlen untersucht, wobei beide Tibien durch Abbin- dung geschützt waren und mit einer ungeschütz- ten Kontrollgruppe verglichen wurden.

Folgende Werte (siehe Tab. 3) wurden gefunden und in die Kurve Abb. 8 übertragen:

Tab. 3.

Knochenmarkszellen

Tage nach Inj.	1	3	4	7	9	11	14
Ohne Abbindung	670	505	648	666	636	721	672
Mit Abbindung	912	893	596	679	699	725	833

Tage nach Inj.	16	18	21	24	28	31	35
Ohne Abbindung	740	888	1003	982	936	1091	1204
Mit Abbindung	777	975	963	1131	1014	1126	1223

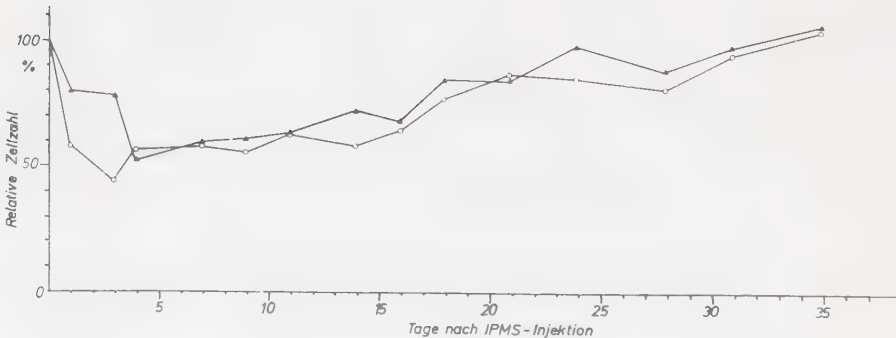


Abb. 8. Die Veränderungen der Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark von Tieren ohne und mit abgebundener Extremität bei 120 mg IPMS/kg KG.

○ Kurve A : Tiere ohne Abbindung

▲ Kurve B : Tiere mit Abbindung

Die Zellzahlen der geschützten Tiere sinken trotz Schutz durch die Abbindung bis zum 4. Tag ab. Darauf folgt ein langsamer aber stetiger Anstieg der Zellzahlen bis der Normalwert zwischen dem 31. und 35. Tag wieder erreicht wird.

Bei den ungeschützten Tieren zeigt sich bis auf einen in der Anfangsphase (bis zum 3. Tag) weit steileren Abfall der Zellzahlen keine bedeutende Abweichung der Kurve von der der geschützten Tiere, doch liegen die Werte größtenteils geringfügig niedriger als bei den Tieren mit Abbindung.

c.) In den gleichen Tiergruppen wurde auch die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut untersucht.

Folgende Werte (Tab. 4) wurden gefunden und in die Kurven der Abb. 9 (Seite 20) übertragen:

Tab. 4.

Periphere Blutzellen

Tage nach Inj.	1	3	4	7	9	11	14	16
Ohne Abbindung	91	94	92	67	53	91	57	97
Mit Abbindung	96	107	110	84	77	79	87	76

Tage nach Inj.	18	21	24	28	31	35
Ohne Abbindung	66	131	105	92	107	176
Mit Abbindung	132	142	142	144	149	183

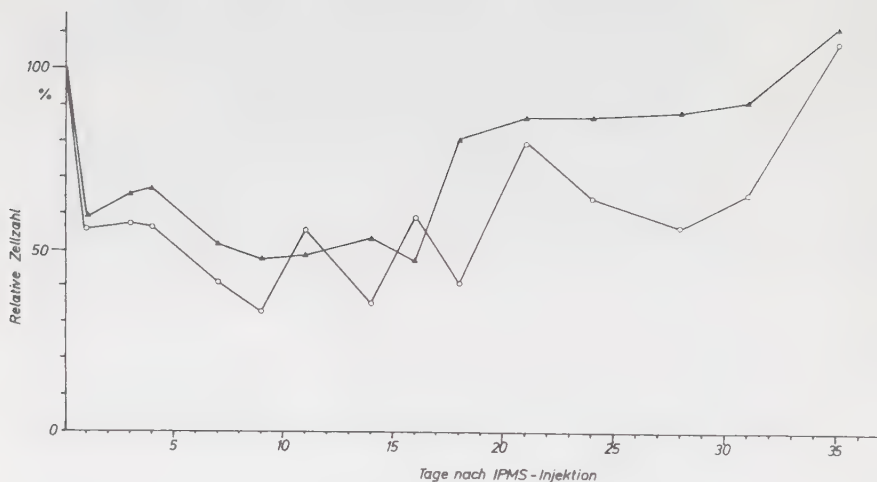


Abb. 9. Die Veränderungen der Leukozytenzahlen im peripheren Blut von Tieren ohne und mit abgebundener Extremität bei 120 mg IPMS/kg KG

- Kurve A : Tiere ohne Abbindung
- ▲ Kurve B : Tiere mit Abbindung

Die beiden Kurven der Abb. 9 zeigen am 1. Tag einen steilen Abfall der Zellzahlen und bis zum 4. Tag einen leichten Anstieg; vor allem bei den Tieren mit Abbindung.

Vom 5. - 9. Tag schließt sich eine Periode des langsamen Abfalls der Zellzahlen an.

Die Erholung setzt in beiden Gruppen etwa mit dem 10. Tag ein. Eine auffallende sprunghafte Erhöhung der Zellzahlen ergibt sich jedoch erst

zwischen 16. und 18. Tag bei den Tieren mit Abbindung und um 2 Tage verzögert bei den Tieren ohne Abbindung (zwischen 18. und 21. Tag).

Bis auf zwei Werte, die wahrscheinlich Artefakte sind, liegt die Zahl der Zellen im peripheren Blut bei den geschützten Tieren immer höher als bei den ungeschützten.

Der Normalwert wird von beiden Gruppen zwischen dem 31. und 35. Tag wieder erreicht und sogar leicht überschritten.

4. Der Einfluß des Zeitpunktes der IPMS-Injektion auf die Wirkung der Abbindung.

Da die vorhergehenden Versuche einen Schutz der Knochenmarkszellen durch die Abbindung ergeben hatten, die Abbindung die Überlebenszeit der Tiere aber eher verkürzte, mußte der Einfluß des Zeitpunktes der Abbindung näher untersucht werden.

Dazu wurde bei zwei Versuchsgruppen eine Abbindung vorgenommen, wobei nur der Zeitpunkt der Injektion in Hinblick auf die Abbindung variiert wurde.

- a.) In der Gruppe 1 erfolgte die Injektion von 210 mg IPMS/kg KG nach der Narkose und während der Abbindung. Die Abbindung wurde nach ca. 30 min gelöst.
- b.) In der Gruppe 2 dagegen wurde nach der Narkotisierung für ca. 30 min abgebunden. Erst 45 min nach der Lösung der Abbindung wurden 210 mg IPMS/kg KG injiziert.

Die Absterbekurven in beiden Gruppen sind in Abb. 10 (siehe S. 22) dargestellt.

Da in der Gruppe 1 ein Tier während der Narkose starb, mußte bei der Berechnung dieser Gruppe von 9 Tieren ausgegangen werden.

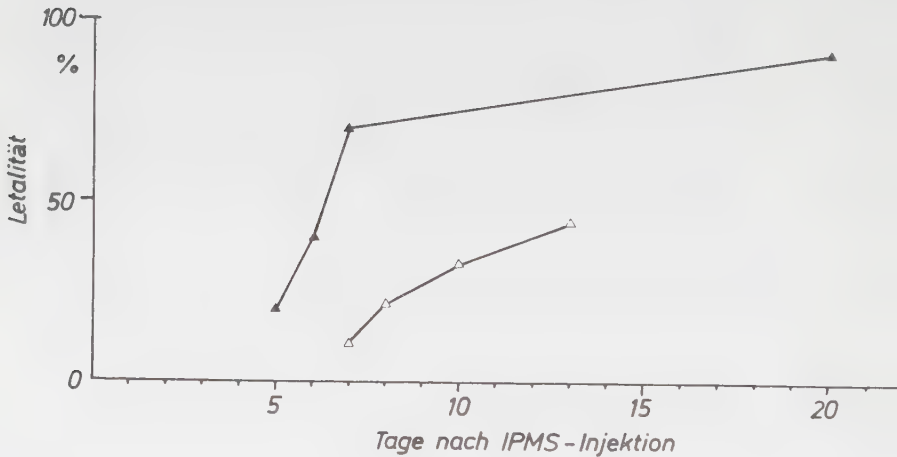


Abb. 10. Die Letalität von NMRI-Mäusen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Injektion von 210 mg IPMS/kg KG

- Δ Gruppe 1 : Injektion während der Abbindung
- ▲ Gruppe 2 : Injektion erst 45 min nach Lösung der Abbindung

Aus der Abb. 10 ist ersichtlich, daß ein eindeutiger Schutzeffekt bei den Tieren auftritt, bei denen die Injektion während der Abbindung erfolgte.

Durch die Abbindung wurde die Letalität um die Hälfte gesenkt (von 90% auf 45%) sowie die mittlere Überlebensdauer der gestorbenen Tiere deutlich, d.h. von 6 auf 9 Tage verlängert.

5. Einfluß der durch die Abbindung bedingten Hypoxie über 60 min auf die Knochenmarkstammzellen.

Zur Auswertung der mit der Milzkolonienmethode gewonnenen Ergebnisse mußte geprüft werden, ob die Abbildung selber nicht auch einen schädigenden Effekt auf das Knochenmark ausübt. Aus diesem Grunde wurde die Zahl der Knochenmarkstammzellen in für 60 min abgebundenen Tibien mit denen nicht abgebundener Tibien verglichen.

Beim Auszählen der Milzkolonien ergaben sich folgende Werte:

Tab. 5

Milzkolonien (KM von Tieren mit Abbdg.)		Milzkolonien (KM von Tieren ohne Abbdg.)	
250 000 Zellen injiziert (i.v.)		250 000 Zellen injiziert (i.v.)	
parietal	gesamt	parietal	gesamt
24	54	24	46
26	47	22	45
31	54	29	51
28	52	23	45
23	45	27	50
		26	43
132 : 5	252 : 5	151 : 6	280 : 6
26	50	25	47
Kolonien pro Milz	Kolonien pro Milz	Kolonien pro Milz	Kolonien pro Milz

Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, daß die Zahl der Milzkolonien bei beiden Tiergruppen etwa gleich groß ist, und somit die mit der einstündigen Abbindung verbundene Hypoxie keinen Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit und Transplantabilität der Knochenmarkstammzellen hat.

6. Die Abhängigkeit der Kolonienbildungsfähigkeit von Knochenmarkstammzellen von der IPMS-Dosis.

Die Zahl der Milzkolonien wurde mit der jeweils transplantierten Zellzahl in Relation gesetzt, und der Prozentsatz der überlebenden und Milzkolonien bildenden Zellen errechnet und in Tab. 6, Seite 27 festgehalten.

Die Werte aus Spalte (8) und (9) wurden in Abb. 11, Seite 25 übertragen, und damit die Punkte für die Dosiswirkungskurve von IPMS in dem bei strahlenbiologischen Untersuchungen üblichen halblogarithmischen Maßstab dargestellt.

In Abb. 11, Seite 25 ist die Anzahl der Kolonien in Prozenten bei Tieren ohne Abbindung mit ihren entsprechenden Standardabweichungen eingetragen.

Die Dosiseffektkurve A entspricht in ihrer Form weitgehend den Kurven der Inaktivierung von Säugetierzellen bei Einwirkung locker ionisierender Strahlen (Röntgen- oder Gammastrahlen) in vitro und in vivo. Wie diese weist sie in halblogarithmischer Darstellung eine "Schulter" auf, die in eine Gerade, d.h. in einen exponentiellen Verlauf übergeht.

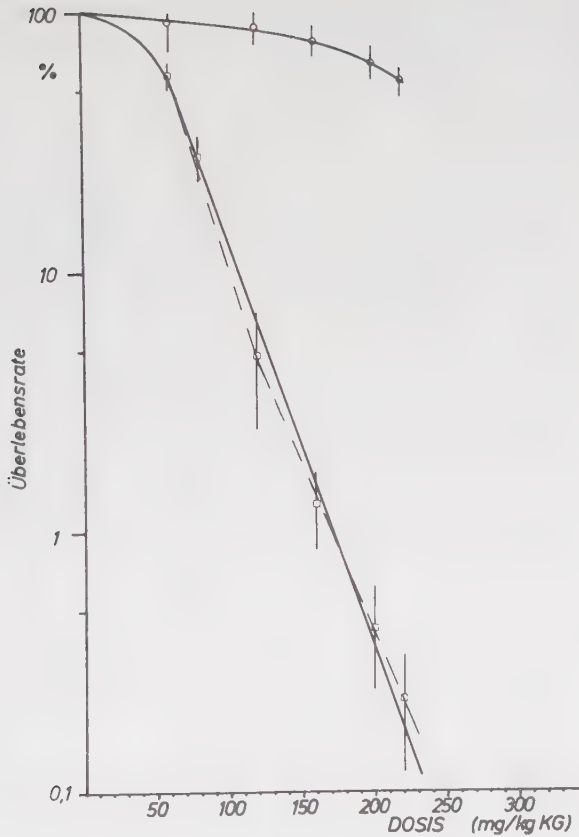


Abb. 11. Überlebensrate von koloniebildungsfähigen Knochenmarkstammzellen in Abhängigkeit von verschiedenen IPMS-Dosen

□ Kurve A : Milzkolonien aus Knochenmark von Tieren ohne Abbindung

1. durchgezogene Linie = vermuteter Verlauf der Dosiseffektkurve A

2. gestrichelte Linie = biphasische Dosis-effektkurve A mit Knick (s. im Text S. 26)

○ Kurve B : Milzkolonien aus Knochenmark von Tieren mit Abbindung

Diese Form einer Kurve wird üblicherweise durch folgende Größen charakterisiert (siehe u.a. Kellerer und Hug, 1972) :

1.) D_0

Diese Größe gibt die Dosis an, durch die im exponentiellen Teil der Kurve, die jeweils noch vorhandene Zahl der Zellen auf $\frac{1}{e} \approx 37\%$ reduziert wird, wobei e die Basis der natürlichen Logarithmen ist.

2.) Extrapolationszahl

Diese Größe ergibt sich, wenn man den geraden Teil der Kurve bis zur Ordinate hin verlängert. Ihr Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der Extrapolationszahl.

3.) $\bar{D}$

Die mittlere Inaktivierungsdosis ($\bar{D}$) ermittelt sich aus der Fläche unter der Kurve.

a.) Für die Kurve A der Abb. 11 (S. 25) ergeben sich folgende Werte :

Die mittlere Inaktivierungsdosis $\bar{D}$ beträgt 69,56 mg IPMS/kg KG.

Die relative Steilheit ist: $S = 4,66$.

Der exponentielle Teil der Kurve läßt sich durch eine D_0 von 29 mg charakterisieren. Die Breite der Schulter kann durch eine D_9 von 45 mg, bzw. eine Extrapolationszahl von 5,9 gekennzeichnet werden.

b.) Wenn man die Mittelwerte der Versuchspunkte miteinander verbindet, ergibt sich eine biphasische Dosiseffektkurve mit einem Knick (gestrichelte Linie in Abb. 11, Seite 25).

Auch wenn kein Bezug zu der in dieser Arbeit behandelten Thematik besteht, so sei doch darauf hingewiesen, daß die Abweichung der Versuchspunkte in dem vermuteten geraden Teil der

Dosiswirkungskurve durchaus real sein kann und offen läßt, ob dies die Auswirkung zweier unterschiedlich empfindlicher Subpopulationen ist, wie es von van Putten und Lelieveld (1970/71) beschrieben wurde. Wir kommen darauf noch in der Diskussion (Seite 39) zurück.

7. Die Abhängigkeit der Kolonienbildungsfähigkeit von Knochenmarkstammzellen in abgebandenen Beinen von der IPMS-Dosis.

Bei den Spendertieren mit abgebandenen Extremitäten erfolgte die intraperitoneale Injektion der verschiedenen IPMS-Dosen (60, 120, 160, 200 und 220 mg/kg KG) erst nach der Abbindung von beiden Unterschenkeln.

Die Abbindung blieb für 40 min erhalten. Die Mäuse wurden 10 min nach Lösung der Abbindung getötet, und das Knochenmark der abgebandenen Extremitäten in gleicher Weise wie bei den Tieren ohne Abbindung zur Milzkolonientestung aufgearbeitet. Die Zahl der Milzkolonien wurde mit der jeweils transplantierten Zellzahl in Relation gesetzt und der Prozentsatz der Überlebenden, d.h. der Milzkolonien bildenden Zellen errechnet und in Tab. 7 (Seite 29) festgehalten.

Die Werte aus den Spalten (8) und (9) wurden in die Abb. 11, Seite 25, (Kurve B) übertragen.

Die daraus resultierende Kurve B verläuft viel flacher als die entsprechende Kurve ohne Abbindung (Kurve A).

Bei der höchsten angewandten Dosis IPMS (220 mg) betrug die Überlebensrate immer noch ca. 55 % und war damit genauso hoch wie bei den Tieren ohne Abbindung nach einer Dosis von ca. 60 mg.

Die Abbindung reduziert den Effekt des Cytostatikums in diesem Wirkungsbereich also um den Faktor 3,66.

DOSIS IPMS	ZAHLE- TRANSPL. ZELLEN	ZAHLE- UNTER- BÄNDEN	ZAHLE- DER TIERE	ZAHLE- DER KOLONIEN IM EIN- ZELNEN TIER (MILZ)	ZAHLE- DER KOLONIEN PRO TIER (MILZ)	STANDARD- ABWEICH- UNG = σ $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$	ZAHLE- DER KOLONIEN PRO 10 ⁶ TRANSPL. ZELLEN MITTEL- WERT = $\frac{\bar{x}}{10^6}$	PROZENT DER ZAHLE- DER KOLONIEN EINZELNEN DOSEN GEGEN- ÜBER DER ZAHLE- DER KOLONIEN BEI DER DOSIS 0 (NULLWERT)	PROZENT UNTER EINRECHNUNG VON σ (% $\pm \sigma$ in %)
mg/kg KG pro 0,5 ml Suspension									
0	150.000	8 von 8	34, 29, 31, 30, 32, 24, 37, 32	31	$\pm 3,8$	207	100 %	-	
60	100.000	8 von 8	16, 12, 19, 22, 25, 22, 22, 15	19	$\pm 4,4$	190	91,8 %	113,00 % 70,53 %	
120	200.000	2 von 10	41, 33	37	$\pm 5,7$	185	89,37 %	103,14 % 75,60 %	
160	300.000	10 von 10	42, 64, 51, 45, 55, 43, 48, 48, 43, 49	49	$\pm 6,7$	163	78,7 %	89,86 % 68,11 %	
200	350.000	10 von 10	61, 48, 47, 53, 49, 47, 38, 38, 48, 45	47	$\pm 6,7$	134	64,7 %	73,91 % 55,56 %	
220	300.000	10 von 10	37, 28, 40, 33, 41, 36, 31, 34, 32, 31	34	$\pm 4,2$	113	54,6 %	61,35 % 47,83 %	

Der Verlauf der Kurve B in Abb. 11 (S. 25) läßt vermuten, daß auch sie ähnlich wie Kurve A bei noch höheren Dosen in eine Gerade übergeht, sodaß sich wiederum die Form einer Schulterkurve ergäbe.

In Tab. 8 sind zum Vergleich die Kolonienzahlen pro 1 Million transplantierte Zellen bei verschiedenen IPMS-Dosen aus abgebundenen und nicht abgebundenen Extremitäten gegenübergestellt.

Tab. 8.

Dosis (mg/kg KG)	0	60	120	160	200	220
nicht abgebunden	207	120	10	2,7	0,89	0,48
abgebunden	207	190	185	163	134	113
Überlebens- verhältnis	0	1,58	18,5	60,4	150,6	235,4

$$\text{Überlebensverhältnis} = \frac{\text{Kolonienzahl bei Abbindung}}{\text{Kolonienzahl ohne Abbindung}}$$

IV. Diskussion :

Zusammenfassung der Ergebnisse :

Bei Mäusen konnte bei einer IPMS-Injektion direkt nach der Abbindung einer Extremität, die für die Dauer von 30 - 40 min bestehen blieb, ein deutlicher Schutzeffekt demonstriert werden, der sich darin äußerte, daß die Zahl der überlebenden Knochenmarkstammzellen höher lag, und daß die Zahlen der peripheren Leukozyten und der kernhaltigen Knochenmarkzellen schneller anstieg als ohne Abbindung.

Daß dennoch die Letalwirkung des Cytostatikums durch eine Abbindung nicht signifikant beeinflusst wurde, lag offenbar daran, daß die Abbindung selbst bei den kleinen Versuchstieren einen schweren Schaden verursachte. Dies geht aus vergleichenden Untersuchungen hervor, bei denen die Abbindung einmal während und einmal vor der Injektion angelegt war. In diesen Untersuchungen war die Letalität der Tiere mit Simultanbehandlung eindeutig geringer (siehe Seite 21).

Im einzelnen seien folgende Versuchsergebnisse diskutiert:

1. Die Veränderung des Körpergewichts und der Letalität bei einer Extremitätenabbindung und nach verschiedenen IPMS-Dosen.

Der aus Abb. 1 (Seite 8) ersichtliche anfängliche Gewichtsverlust ist vermutlich die Folge einer Darmschädigung durch die intraperitoneale Injektion von IPMS. Bei den vom 5. - 8. Tag verstorbenen Tieren scheint die Todesursache in der schweren Darmschädigung zu liegen. Dafür spricht die Symptomatik mit schweren Durchfällen, und im übrigen die Erfahrung, daß auch eine massive Schädigung

der Schleimhäute des Magen-Darm-Kanals durch Bestrahlung mit hohen Dosen bei Mäusen in diesem Zeitraum zum Tode führt, während die Störungen der Hämo-poese meist erst nach zwei Wochen tödlich sind.

Die vorübergehende Erholung des Körpergewichts um den 9. bis 13. Tag, die sich bei den niedrigen Dosen in einem temporären Wiederanstieg und bei höheren Dosen in einer Verzögerung des Gewichtsabfalls äußert, hängt möglicherweise mit der Gesundung des Darms zusammen. Der anschließende erneute Gewichtsabfall vom 14. bis ca. 21. Tag ist vermutlich allgemein toxischer Art und Ausdruck der Knochenmarkschädigung.

In den mittleren und niedrigen Dosisbereichen ist die Knochenmarkschädigung die Haupttodesursache, sodaß ein Schutzeffekt durch eine Abbindung am besten bei diesen Dosen geprüft werden kann.

Bei IPMS-Dosen von 250 und 300 mg/kg KG kommen die Tiere mit Extremitätenabbindung früher ad exitum als die Tiere ohne Abbindung.

Es ist somit zu fragen, warum sich der eindeutige Schutzeffekt der Abbindung einer Extremität auf deren Knochenmark nicht in einer Verminderung der Letalwirkung der Versuchstiere äußert. Folgende Möglichkeiten sind zu diskutieren:

- a.) Die durch die Abbindung auftretende Hypoxie über 30 - 40 min schädigt die Knochenmarkszellen irreversibel.

Diese Möglichkeit wird durch die in Tab. 5 (S. 23) aufgeführten Ergebnisse widerlegt. Man kann folgern, daß die Abbindung über eine Stunde und die damit verbundene Hypoxie keinen Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit und Transplantabilität der Knochenmarkstammzellen hat.

- b.) Bei Tieren mit Abbindung verteilt sich das IPMS in einem kleineren Blutvolumen, woraus eine höhere Konzentration im Blut und damit eine stär-

kere Wirkung auf die Gewebe des übrigen Körpers resultiert.

Da das Gewicht des abgebundenen Beines nur etwa 4 % des Körpergewichts ausmacht, und das Versuchstier ein Gesamtblutvolumen von ca. 2,5 bis 3,0 ml hat (Schermer, 1954), würde durch die Abbindung das für die Verteilung von IPMS verfügbare Blutvolumen um ca. 0,12 ml vermindert. Das könnte zu einer Erhöhung der Blutkonzentration von etwa 5 % führen, würde aber einen solch negativen Effekt nicht erklären können.

c.) Wahrscheinlich handelt es sich um einen Kombinationsschaden.

Durch die Abbindung kommt es zu erheblichen Verletzungen mit Blutungen, Quetschungen und Abrissen der Muskulatur sowie späteren umfangreichen Muskelnekrosen. Hierbei könnte ein CRUSH-Syndrom eine wesentliche Rolle spielen.

Hinzu kommt, daß die Muskelschäden eine erhebliche Immobilisation der Tiere bedingen. Die Immobilisation ist mit einer Erschwerung der Nahrungs- und Wasseraufnahme verbunden, die zusammen mit der Schädigung des Magen-Darm-Kanals den Allgemeinzustand der Tiere verschlechtert.

Eventuell kommt es auch durch Schädigung der Blutgefäße an der Abbindestelle (z.B. durch Thromben oder gar einen Abriß) zu einer verminderten und verzögerten Auswanderung der Knochenmarkzellen aus dem abgebundenen Bein.

Die Interpretation der erhöhten Letalität der Tiere mit Abbindung als einen Kombinationsschaden wird durch die Versuche gestützt, in denen Abbindung und IPMS-Injektion nicht gleichzeitig, sondern nacheinander erfolgten (Abb. 10, Seite 22).

Leider war es aus zeitlichen und technischen Gründen nicht möglich, dann, als die nachteilige

Wirkung der Abbindung bei den kleinen Versuchstieren erkannt war, neue Versuche mit verbesserter Abbinde-technik und mit größeren Tieren durchzuführen.

Im übrigen mußten die Versuche mit Mäusen durchgeführt werden, da bei anderen Tieren die Anwendung der Milzkolonienmethode noch nicht möglich ist.

2. Der Einfluß verschiedener IPMS-Dosen auf die Zahl kernhaltiger Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut.

Die von uns angewandte Methode der Zählung von Knochenmarkszellen gibt selbstverständlich nur Annäherungswerte, denn wenn die Länge des 7 mm langen Tibiateilstückes nur um Bruchteile eines Millimeters über- oder unterschritten wird, kann schon eine größere Verfälschung des Ergebnisses auftreten. Das vor allem, da die Mäusetibia proximal dicker und markhaltiger wird. Ein weiterer Nachteil ist es, daß hierbei nicht nur Knochenmarkstammzellen, sondern alle Zellen aus dem Knochenmark (außer Erythrozyten) gezählt wurden, und daher auch devitalisierte, aber grob morphologisch noch unveränderte Zellen.

Die Einwirkung des Cytostatikums auf das hämopoetische System muß als die Störung eines stationären Zustandes - eines Fließgleichgewichtes - betrachtet werden, das gegeben ist durch die Neubildungsrate der Zellen einerseits und die Ausschwemmungsrate bzw. Absterberate der Zellen andererseits.

Wie Abb. 8 (Seite 18) zeigt, kommt es vermutlich durch Abtötung proliferierender Zellen und durch temporären Stop der Zellneubildung im Knochenmark in den ersten Tagen nach Behandlung zu einem Abfall der Zellzahlen und vom 4. Tag an zu einem Wiederanstieg, durch den nach etwa 30 Tagen der ursprüngliche stationäre Zustand wieder erreicht wird. Bis zum 3. Tag ist diese Abnahme im

Knochenmark der abgebundenen Extremität deutlich geringer als ohne Abbindung.

In der Phase der Erholung liegen die Werte allerdings nur noch geringfügig über denen des Kontrollversuchs mit Tieren ohne Abbindung.

Das Verhalten der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes spiegelt weitgehend die Störung der Zellproliferation im Knochenmark wider. Dabei muß jedoch angenommen werden, daß der steile Abfall der Zellzahlen am 1. Tag vorwiegend bedingt ist durch die Abtötung der peripheren Lymphozyten, möglicherweise aber auch durch eine Abwanderung der Granulozyten in die geschädigten Gewebe. Die anschließende Depression der Zellzahlen ist sicherlich Ausdruck der gestörten Hämpoese im Knochenmark. Sie hält bis zum 16. Tag an und erst dann erfolgt eine deutliche, aber langsame Rückkehr zur Norm.

Die Zellzahlen bei Tieren mit Extremitätenabbindung liegen trotz gewisser statistischer Schwankungen meist erheblich über denen ungeschützter Tiere.

Möglicherweise werden die Kurvenverläufe in den ersten Tagen nach Behandlung dadurch beeinflußt, daß die Schädigung des Organismus zu einer reaktiven Ausschüttung von Zellen aus dem Knochenmark führt. So ließe sich erklären, daß zu dem Zeitpunkt zu dem die Zellzahlen im Knochenmark ihr Minimum erreichen (3. - 4. Tag), im peripheren Blut ein vorübergehender Wiederanstieg der Zellzahlen beobachtet wird. Dabei erfolgt offenbar auch eine Ausschwemmung von Zellen aus der geschützten Extremität.

B. W. Fox (1966) fand nach Injektion von 20 mg IPMS/kg KG bei Affen erst in der zweiten bis dritten Woche einen Abfall der neutrophilen Granulozytenzahl im peripheren Blut auf ca. 5 %.

Die Erholung auf die Normalwerte dauerte 6 - 7 Wochen. Im Gegensatz zu unseren Befunden an Mäusen beobachtete er keine Veränderung der Zahl der Granulozyten in der 1. Woche nach der IPMS-Injektion.

Diese Unterschiede in der Reaktion zwischen Mäusen und Affen finden sich auch bei der Reaktion der peripheren Granulozyten auf Ganzkörperbestrahlung (Bond, Fliedner, Archambeau, 1965).

3. Abhängigkeit der Koloniebildungsfähigkeit von Knochenmarkstammzellen von der IPMS-Dosis in abgebundenen und nicht abgebundenen Extremitäten.

Bei der verwendeten Zählmethode für Knochenmarkzellen wurden alle im Knochenmark vorhandenen Zellen gezählt.

Für die depressive Wirkung auf die Hämoopoese durch Cytostatika ist aber vornehmlich die Wirkung auf Knochenmarkstammzellen entscheidend. Diese können mit der Milzkolonientechnik, wie sie von Till und Mc Culloch schon 1961 beschrieben und in den folgenden Jahren in mehr oder weniger großen Modifikationen angewandt wurde, quantitativ erfaßt werden (Laijtha und Schofield, 1969; Becker, Mc Culloch und Till, 1963; Lahiri und van Putten, 1969).

Der Kolonienbildung liegt folgender Vorgang zugrunde:

Die injizierten Zellen werden, soweit es sich um Stammzellen handelt, in den Markhöhlen und in der Milz angesiedelt und beginnen dort zu proliferieren (Till und Mc Culloch, 1961; Lahiri und van Putten, 1969). Dabei werden wahrscheinlich aus den Knochenmarkstammzellen Typ 1 (= primitive pluripotentialem cells, die den sog. colony-forming cells (CF) entsprechen) durch Teilung wieder Stammzellen vom Typ 1, aber auch Stammzellen vom Typ 2

(= undifferentiated committed precursor cells).

Die Stammzellen vom Ty₁ 2 sind schon so weit differenziert, daß sie unter den Versuchsbedingungen der Milzkolonientechnik keine makroskopisch sichtbaren Kolonien bilden, weil sie nur noch zu einer beschränkten Anzahl von Zellteilungen imstande sind.

In histologischen Präparaten der Milzkolonien sahen Till und Mc Culloch, 1961 und Silini, Pons und Pozzi, 1968 eine größere Zahl von Erythroblasten (mehr im Zentrum der Kolonien) und eine kleinere Zahl von Myelozyten und Metamyelozyten (mehr in der Peripherie). In vielen Kolonien fanden sie sog. Nester mit mehreren Megakaryozyten.

Für unsere Untersuchungen sind folgende Feststellungen von Becker, Mc Culloch und Till, 1963 und von M. Fox und Zeiss, 1961 von besonderer Wichtigkeit.

- a.) Die Zahl der Kolonien ist der Zahl der transplantierten Zellen direkt proportional.
- b.) Es gibt Hinweise dafür, daß sich jede Kolonie aus einer einzigen Stammzelle entwickelt.

Die Milzkolonientechnik, die primär für die Behandlung strahlenbiologischer Probleme entwickelt wurde, bietet sich auch zur Testung der Wirkung von Cytostatika an.

Zum Beispiel wurde die Wirkung von Cyclophosphamid, Melphalan, Chlorambucil und Stickstoff-Lost von van Putten und Lelieveld 1970/71 mit der Milzkolonienmethode getestet.

Die Wirkung von IPMS dagegen ist bisher zwar schon an Säugetierzellen in vitro untersucht (Petrovic und Nias, 1967), sowie in den erwähnten Arbeiten von B.W. Fox (1966) auf das periphere Blutbild von Affen, jedoch bisher nur einmal mit

der Milzkolonienmethode (Schofield und Garcia-Testa, 1970). Aus diesem Grund seien die von uns mit dieser Methode gewonnenen Dosiswirkungskurven ausführlicher diskutiert als es die Thematik unserer Arbeit erfordert.

In Abb. 11, S. 25 ist die Verminderung der Zahl der Stammzellen im Knochenmark in Abhängigkeit von der IPMS-Dosis 40 min nach intraperitonealer Injektion dargestellt. Diese Dosiseffektkurve (Kurve A) hat Ähnlichkeit mit entsprechenden Kurven nach Bestrahlung (siehe Till und McCulloch, 1961 und Hendry und Howard, 1971).

Sie ist gekennzeichnet durch einen Bereich niedrigerer Empfindlichkeit bei kleineren Dosen. Die Neigung der Dosiseffektkurve nimmt schließlich oberhalb von Dosen von ca. 60 mg/kg KG einen nahezu konstanten Wert an.

Entsprechend den in der Strahlenbiologie üblichen Formalismen wäre diese Kurve durch eine mittlere Inaktivierungsdosis von 69,56 mg/kg KG und eine relative Steilheit von 4,66 sowie der D_0 von 29 mg IPMS/kg KG, der D_q von 45 mg IPMS/kg KG und einer Extrapolationszahl von 5,5 zu beschreiben.

Im Vergleich zu Strahlenexperimenten fällt auf, daß die Extrapolationszahl wesentlich größer ist. In Experimenten mit Bestrahlung liegt sie selten über 2, erreicht jedoch in unseren Versuchen den Wert von 5,5. Das bedeutet, daß Knochenmarkstammzellen gegenüber kleinen Dosen von IPMS eine ausgeprägte Kompensationsfähigkeit besitzen, die mit zunehmender IPMS-Dosis geringer wird. Ob sich bei fraktionierter Gabe von IPMS diese Kompensationsfähigkeit bei den überlebenden Stammzellen wiederholt, wie das bei fraktionierter Bestrahlung bei Zellen in vitro (Elkind und Sutton, 1960) wie auch bei Knochenmarkstammzellen

(Hendry und Howard, 1971) nachgewiesen ist, konnte von uns nicht untersucht werden.

Aus strahlenbiologischen Untersuchungen an Säugetierzellen in vitro und in vivo mit fraktionierter Verabreichung der Strahlendosis ist bekannt, daß sich bei Intervallen von mehreren Stunden zwischen zwei Fraktionen die überlebenden Zellen vom subletalen Strahlenschaden erholen können.

Dies macht sich dadurch bemerkbar, daß die Zellen gegenüber der Zweitbestrahlung wieder die gleiche geringere Empfindlichkeit haben wie gegenüber kleinen Dosen einer Erstbestrahlung; es bildet sich also gegenüber der Zweitbestrahlung wieder eine " Schulter " aus. Der Gesamteffekt einer fraktionierten Bestrahlung mit Intervallen von mehreren Stunden ist also geringer als eine Einzeitbestrahlung mit gleicher Dosis. Die Erklärung liegt bei den strahlenbiologischen Experimenten darin, daß die Zellen im Intervall ihre Kompensationsfähigkeit wiedergewonnen haben.

Bei alkylierenden Cytostatika in vitro tritt dieser Erholungseffekt der " Schulter " nicht auf, wie z.Zt. von anderen Mitarbeitern unseres Labors festgestellt wurde.

Bei genauer Analyse der Kurve kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie einen biphasischen Verlauf hat, der auf zwei fast gleichgroße Subpopulationen schließen läßt, die unterschiedliche Empfindlichkeit gegen IPMS aufweisen. Ein solcher Knick der Dosiseffektkurven wurde von van Putten und Lelieveld (1970/71) für verschiedene alkylierende Cytostatika u.a. Cyclophosphamid, Melphalan, Chlorambucil und Stickstoff-Lost gefunden.

Sie wiesen mit ihren Versuchen nach, daß die zwei Subpopulationen den proliferierenden Stammzellen einerseits und den nicht proliferierenden andererseits entsprechen.

In einem orientierenden Versuch haben wir festgestellt, daß bei den von uns verwendeten Tieren weniger als 20 % der Zellen proliferieren.

Auch wenn eine Deutung der Dosiseffektkurve im Sinne von van Putten und Lelieveld nicht ausgeschlossen werden kann (wobei die nicht proliferierenden Stammzellen um etwa 30 % resistenter wären als die proliferierenden), halten wir den Effekt für zu gering, um sichere Schlüsse daraus zu ziehen.

Mittels eines weiteren Versuches (Abb. 11, S. 25, Kurve B) wurde eine Dosiseffektkurve mit Zellen aus Tibien aufgestellt, die während der Injektion von IPMS abgebunden waren. Diese Kurve B zeigt zwar einen erheblichen Schutz der Knochenmarkstammzellen in abgebundenen Beinen, jedoch findet sich auch hier bei steigender Dosis ein Nachlassen der Fähigkeit zur Kolonienbildung.

Dieser Residualeffekt des IPMS auf das Knochenmark der abgebundenen Extremitäten kann darauf beruhen, daß entweder die arterielle Unterbindung nicht vollständig ist oder daß nach Lösung der Abbindung der zu diesem Zeitpunkt noch im Blut kreisende Anteil des Cytostatikums nunmehr auch im Knochenmark der abgebundenen Extremität zur Wirkung kommt.

Geht man von der Annahme aus, daß die Abbindung die Blutzufuhr zur Extremität komplett unterbricht, so ließen sich aus unserer Studie Schlüsse auf die Clearancerate des Cytostatikums im Blut ziehen.

Nach einer 40 min langen Abbindung entspricht die Wirkung von 220 mg IPMS bei Tieren mit Abbindung der Wirkung von 60 mg IPMS bei Tieren ohne Abbindung.

Daraus könnte man unter der oben gemachten Annahme und unter der Voraussetzung, daß die Resorption aus dem Peritoneum in relativ kurzer Zeit erfolgt und daß die Clearance des aktiven IPMS im Blut einer Exponentialfunktion folgt, die biologische Halbwertszeit des IPMS berechnen.

Nach 40 min ist die wirksame Dosis nur noch $\frac{60}{220}$, das entspricht 27 %. Somit ergibt sich eine biologische Halbwertszeit ($T^{1/2}$) von 21 min. Sie ist demnach fast um die Hälfte länger als in der Literatur unter in vitro-Bedingungen angegeben.

Wie eingangs erwähnt, beträgt die Halbwertszeit des IPMS bei pH 7 und 37°C 13 Minuten.

Es ist verwunderlich, daß die in unseren Versuchen ermittelte biologische Halbwertszeit länger ist, vor allem weil unter in vivo-Bedingungen nicht nur mit einem Abbau der gelösten Substanz, sondern auch mit ihrer Metabolisierung und dem Abwandern in die Gewebe zu rechnen ist. Entweder also ist die Zerfallsrate des IPMS im Blut wesentlich geringer als in wässriger Lösung oder es muß eben doch damit gerechnet werden, daß während der Zeit der Abbindung schon ein gewisser Teil des Cytostatikums auf das Knochenmark in der abgebundenen Extremität eingewirkt hat.

Jedenfalls aber ergibt sich aus unseren Versuchen ein Weg um mit verbesserten Abbindungstechniken die Clearance eines Cytostatikums zu testen.

Unsere Versuche bei Mäusen haben gezeigt, daß die toxische Wirkung eines kurzlebigen Cytostatikums auf das hämopoetische System verringert werden kann, durch die Abbindung einer Extremität während seiner initialen Einwirkungszeit.

Der Anstoß zu dieser Arbeit kam von den strahlenbiologischen Erfahrungen über die protektive Wirkung einer Bleiabschirmung von Teilen des Knochenmarks bei Tieren und Ganzkörperbestrahlung.

Daraus entwickelte sich die Vorstellung, daß man durch Schutz von Teilen des Knochenmarks bei der Einwirkung eines Cytostatikums dessen therapeutische Breite erhöhen könnte. Ein weiterer Anlaß war die klinische Erfahrung, daß der störende Haarausfall bei hohen Dosen von Cytostatika auf einfache Weise dadurch verhindert werden kann, daß vor der Injektion ein straffes Gummiband so über die Kopfhaut gespannt wird, daß die Blutzufuhr zum Haarboden stark vermindert wird.

Unsere Ergebnisse erlauben sicherlich keine direkten Konsequenzen, d.h. eine Ausnutzung dieses Schutzeffektes, ermutigen aber zu weiteren Vorversuchen. Insbesondere muß man sich bei einer Übertragung der tierexperimentellen Befunde auf menschliche Verhältnisse klarmachen, daß die Repopulation geschädigten Knochenmarks aus einem geschützten Teil zwar bei kleinen Nagetieren eindeutig nachgewiesen ist, bei anderen Säugetierspezies jedoch nur in wesentlich geringerem Ausmaß oder überhaupt nicht beobachtet werden konnte.

Eine Extremitätenabbindung beim Menschen wäre deswegen erfolglos, weil die Extremitäten nur minimale Mengen blutbildenden Knochenmarks enthalten. Dennoch wird in Zukunft zu diskutieren sein, ob bei nicht generalisierten malignen Erkrankungen gesunde Körperabschnitte mit reichlichem Gehalt an Knochenmark durch zeitweilige Unterbindung oder Herabsetzung der Durchblutung geschützt werden können.

So wäre durchaus zu erwägen, ob nicht bei der Applikation eines kurzlebigen Cytostatikums

zur Behandlung maligner Geschwülste der oberen Körperhälfte kurzfristig die Aorta abdominalis zu komprimieren ist, wobei das rote Knochenmark in den unteren Wirbelkörpern und im Becken und darüber hinaus zumindest Teile der Bauchorgane und Eingeweide vor der initialen und konzentrierten Wirkung der Cytostatika geschützt würden. In diesem Zusammenhang sei an die Versuche erinnert, die Effektivität der Chemotherapie maligner Geschwülste dadurch zu erhöhen, daß man das Cytostatikum in die Arterien, die die Tumorregion versorgen, injiziert.

Wenn dabei nur die hohe Konzentration der ersten Zirkulation durch die betreffende Region ausgenutzt werden kann, so müßte man erwarten, daß umgekehrt eine nur Minuten anhaltende Aortenkompression die entsprechenden Gewebe partiell schützt und dabei durch eine höhere Anfangskonzentration des Cytostatikums eine stärkere Wirkung auf die malignen Geschwülste, die in einer anderen Körperregion gelegen sind, hervorgerufen werden könnte.

V. Zusammenfassung:

1. Die Wirkung verschiedener Dosen des Cytostatikums IPMS auf die Gewichtsänderung und Letalität von abgebundenen und nicht abgebundenen Versuchstieren wurde untersucht.
2. Es wurde eine höhere Letalität bei den abgebundenen als bei den nicht abgebundenen Tieren und ein dosisabhängiger Gewichtsverlust festgestellt.
3. Nach Injektion von unterschiedlichen Dosen IPMS mit und ohne Abbindung wurde eine Abnahme der peripheren Blutzellen sowie eine Knochenmarkdepression und Repopulation in vivo registriert, wobei die Depression in den ersten Tagen bei Tieren mit geschütztem Knochenmark nicht so hoch wie bei den ungeschützten Tieren war.
4. Mit Hilfe der Milzkolonienmethode wurde festgestellt, daß eine Hypoxie von 60 min keinen Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit und Transplantabilität der Knochenmarkstammzellen hat.
5. Bei Injektion von IPMS während einer Abbindung ergab sich ein beträchtlicher Schutz für die Vermehrungsfähigkeit und Transplantabilität der Knochenmarkstammzellen im geschützten Bein.
6. Mit Hilfe der Milzkolonienmethode wurde die Dosiswirkungskurve für IPMS aufgestellt.

7. Durch einen Vergleich der Dosiseffektkurven einmal bei nicht abgebundenen und einmal bei abgebundenen Tieren, wurde über die Feststellung einer nach 40 min noch wirksamen Restdosis die biologische Halbwertszeit von IPMS von ca. 21 min ermittelt.

VI. Literaturverzeichnis :

- BECKER, A. J., Mc Culloch, E.A. and Till, J.E.:
Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
Nature 197, 452-454 (1963)
- BOND, V.P., Fliedner, T.M. and Archambeau, J.O.:
Mammalian radiation lethality. A disturbance in cellular kinetics.
Academic Press, New York, London, 1965
- COLE, L.J.: Hemopoietic restoration in lethally x-irradiated mice injected with peritoneal cells.
Am. J. Physiol. 204, 265-267 (1963)
- CRONKITE, E.P. and Fliedner, T.M.: The radiation syndromes.
Handbuch der medizinischen Radiologie. Bd. II/3, 299-339. Hrg.: O. Hug, München und A. Zuppinger, Bern: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972
- ELKIND, M.M., Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of x-ray damage in surviving chinese hamster cells.
Rad. Res. 13, 556-593 (1960)
- FWLER, J.H., Wu, A.M., Till, J.E., Mc Culloch, E.A. and Siminovitch, L.: The cellular composition of hemopoietic spleen colonies.
J. cell. physiol. 69, 65-83 (1967)
- FOX, B.W.: Comparative action of methyl and isopropyl methane sulfonates on the peripheral leucocyte count in monkeys.
Nature 212, 1058-1059 (1966)
- FOX, M. and Zeiss, I.M.: Chromosome preparation from fresh and cultured tissues using a modification of the drying technique.
Nature 192, 1213-1214 (1961)

- FUJIOKA, S., Hirashima, K., Kumatori, T., Takaku, F. and Nakao, K.: Mechanism of hematopoietic recovery in the x-irradiated mouse with spleen or one leg shielded.
Rad. Res. 31, 826-839 (1967)
- GOODMANN, J.W.: Transplantation of peritoneal fluid cells.
Transplantation 1, 334-346 (1963)
- GOODMANN, J.W. and Hodgson, G.S.: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice.
Blood 19, 702-714 (1962)
- GURNEY, C.W., Lajtha, L.G. and Oliver, R.: A method for investigation of stem cells kinetics.
Brit. J. Haemat. 8, 461-466 (1962)
- HELLMANN, S.: A paradoxical effect of dose rate in partial body irradiation.
Rad. Res. 24, 601-611 (1965)
- HELLMANN, S.: Circulating stem cells: Variation with duration of partial body-x-irradiation.
Nature 205, 100-101 (1965)
- HENDRY, J.H. and Howard, A.: The response of haemopoietic colony-forming units to single and split doses of gamma-rays or D-T neutrons.
Int. J. Rad. Biol. 19, 51-64 (1971)
- JACOBSON, L.O., Marks, E.K., Gaston, E.O., Robson, M.J. and Zirkle, R.E.: The role of the spleen in the radiation injury.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 740-742 (1949)
- JACOBSON, L.O., Marks, E.K. and Gaston, E.G.: Observations on the effect of spleen-shielding and the injection of cell suspensions on survival following irradiation.
Radiobiology symposium 1954, 122-133.
Eds.: Z.M. Bacq and P. Alexander: Butterworth Scientific Publications, London, 1955

- KELLERER, A.M. und Hug, O.: Theory of dose-effect relations.
Handbuch der medizinischen Radiologie. Bd. II/3, 1-42. Hrsg.: O. Hug, München und A. Zuppinger, Bern: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972
- LAHIRI, S.K. and van Putten, L.M.: Distribution and multiplication of colony forming units from bone marrow and spleen after injection in irradiated mice.
Cell and Tissue Kinetics 2, 21-28 (1969)
- LAJTHA, L.G. and Schofield, R.: Proliferative capacity of hemopoietic stem cells.
Recent results in cancer research. Normal and malignant cell growth. 10-114.
Eds.: R.J.M. Fry, M.L. Griem and W. Kirsten: Springer-Verlag, New York Inc., 1969
- LAMERTON, L.F. and Belcher, E.H.: The modification of the radiation response by shielding procedures.
Radiobiology symposium 1954, 136-146.
Eds.: Z.M. Bacq and P. Alexander: Butterworth Scientific Publications, London, 1955
- LORENZ, E., Congdon, C. and Uphoff, D.: Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections.
Radiology 58, 863-877 (1952)
- MC CULLOCH, E.A. and Till, J.E.: The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma-radiation in vitro and in vivo.
Rad. Res. 16, 822-832 (1962)
- MC CULLOCH, E.A. and Till, J.E.: The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice.
Rad. Res. 13, 115-125 (1960)

- MC CULLOCH, E.A. and Till, J.E.: Proliferation of hemopoietic colony-forming cells transplanted into irradiated mice.
Rad. Res. 22, 383-397 (1964)
- MESSERSCHMIDT, O., Langendorff, H., Birkenmayer, E. und Koslowski, L.: Untersuchungen über Kombinationschäden. Über die Lebenserwartung von Mäusen, die zu verschiedenen Zeiten vor und nach einer Ganzkörperbestrahlung mit Hautverbrennungen belastet wurden.
Strahlentherapie 138, 619-626 (1969)
- NOWELL, P.C., Cole, L.J.: Clonal repopulation in reticular tissues of x- irradiated mice: Effect of dose and of limb-shielding.
J. of Cell. Physiol. 70, 17-28 (1967)
- PETROVIC, D. and Nias, A.H.W.: A comparison of the effects upon HeLa cells of isopropyl methane sulphonate and x-rays during different phases of the cell cycle.
Europ. J. Cancer 3, 321-328 (1967)
- PUCK, T.T.: Cellular aspects of the mammalian radiation syndrome. II. Cell depletion in bone marrow, spleen, and thymus of young mice.
Rad. Res. 27, 272-283 (1966)
- van PUTTEN, L.M. and Lelieveld, P.: Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo. I. Part: Cyclophosphamide.
Europ. J. Cancer 6, 313-321 (1970)
- van PUTTEN, L.M. and Lelieveld, P.: Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo. II. Part: Melphalan, Chlorambucil and nitrogen mustard.
Europ. J. Cancer 7, 11-16 (1971)
- ROSS, W.C.J.: Biological alkylating agents.
pp. 111-113: Butterworth, London, 1962

SCHERMER, S.: Blutmorphologie der Laboratoriums-
tiere.

Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1954
SCHOFIELD, R. and Garcia-Testa, N.E.: Effect of
isopropyl methane sulphonate on bone marrow
colony-forming units (CFU).

XIII. International Congress of Hematology,
Munich Aug. 2-8, 1970. Book of abstracts, p. 199
SILINI, G., Pons, S. and Pozzi, L.V.: Quantitative
histology of spleen colonies in irradiated mice.
Brit. J. Haemat. 14, 489-500 (1968)

SIMINOVITCH, L., Till, J.E. and Mc Culloch, E.A.:
Radiation responses of hemopoietic colony-form-
ing cells derived from different sources.
Rad. Res. 24, 482-493 (1965)

SIMINOVITCH, L., Mc Culloch, E.A. and Till, J.E.:
The distribution of colony-forming cells among
spleen colonies.

J. Cellular Comp. Physiol. 62, 327-336 (1963)
TILL, J.E. and Mc Culloch, E.A.: A direct measure-
ment of the radiation sensitivity of normal
mouse bone marrow cells.

Rad. Res. 14, 213-222 (1961)

URSO, P. and Congdon, C.C.: The effect of the
amount of isologous bone marrow injected on the
recovery of hemopoietic organs, survival and
body weight after lethal irradiation injury
in mice.

Blood 12, 251-260 (1957)

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Otto Hug, aufrichtig danken für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, für die wertvollen Anregungen, die für mich außerordentlich hilfreich waren, und für die Freiheit, die er mir bei der Durchführung der Versuche gewährt hat.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. K.R. Trott, der mich durch zahlreiche Ratschläge und Diskussionen unterstützte, sowie allen Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Institutes, deren Assistenz bei einzelnen Versuchen anerkennenswert war.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. Dezember 1944 in Schaafheim Kreis Dieburg als Sohn des Johannes Schlieter und der Anneliese Schlieter, geb. Reining, geboren. Im Jahre 1950 wurden meine Eltern geschieden und meine Mutter heiratete 1951 meinen heutigen Stiefvater Kurt Sauer.

Zu Ostern 1951 erfolgte die Einschulung in die Rebstöckerschule in Frankfurt am Main. Nach 4 Jahren Volksschule wechselte ich zu Ostern 1955 in die Hufnagel-Mittelschule über. Diese verließ ich an Ostern 1961 mit der 'Mittleren Reife'. Am 1. April 1961 trat ich bei der Firma Caltex Deutschland GmbH als kaufmännischer Lehrling ein und bestand meine Kaufmannsgehilfenprüfung aufgrund guter Leistungen vorzeitig nach $2\frac{1}{2}$ Jahren im September 1963.

Während ich in den folgenden Jahren als kaufmännischer Angestellter tätig war, besuchte ich ab Ostern 1964 das Abendgymnasium des Goethe-Gymnasiums in Frankfurt am Main, um die Hochschulreife zu erlangen. Dabei erhielt ich ab 1. Januar 1966 ein Stipendium der Walter-Kolb-Stiftung.

Nach bestandener Reifeprüfung am 10. März 1967 wurde ich von der Ludwig Maximilians-Universität in München für das SS 1967 zum Studium der Humanmedizin zugelassen, wo ich bis zur Ablegung des medizinischen Staatsexamens am 11.12.1973 studierte. Vom 15.1.1974 bis zum 14.5.1974 arbeitete ich als Medizinalassistent bei Herrn Professor Dr. Otto Hug am Strahlenbiologischen Institut der Universität München. In dieser Zeit war ich vorwiegend damit beschäftigt, den experimentellen Teil meiner Dissertation abzuschließen.

